

Oponentský posudek na diplomovou práci Bc. Jana Drahoty „Specifita imunitní odpovědi hostitele na poštípání flebotomy“

Jan Drahota se ve své práci věnuje tradičnímu tématu na Katedře parazitologie PŘF UK, imunitní odpovědi na sliny flebotomů, významných vektorů leishmanií, a významu slin v přenosu těchto patogenů. I když bylo o této problematice popsáno již mnoho papíru, není mechanismus tzv. přenosu patogenů aktivovaného slinami vektora dořešen zejména z hlediska vývoje imunity proti antigenům slin. Laboratoř Petra Volfa pak do této problematiky vnáší další zajímavý a významný aspekt, aspekt specifity imunitní odpovědi proti antigenům slin a význam případné zkřížené antigenní reaktivity pro ovlivnění přenosu patogenů různými druhy flebotomů. Tato problematika se stala nosným tématem předložené diplomové práce.

Diplomová práce je přiměřeně obsáhlá a má klasické členění na úvod a cíle práce, literární přehled, metodiku, výsledky, diskusi a shrnutí. Práce je doplněna stovkou citací a seznamem zkratk.

Literární přehled se soustřeďuje na imunitní odpověď na sliny flebotomů, funkci slin při přenosu leishmaniové infekce a vliv slin na imunitní systém hostitele. Také se dotýká možné vakcíny založené na imunizaci antigeny slin vektora. Kapitola je doplněna obdobnými údaji u komárů jako vektorů významných patogenů. Kapitola je dobře napsaná a podložena velkým množstvím citací. Je doplněna dvěma tabulkami shrnujícími metodiku imunizace hostitelů slinami vektorů a infekci přenášenými patogeny podle jednotlivých publikací. V tabulkách postrádám údaj o vlivu imunizace na přenos patogena, který by byl alespoň pro mne nejzajímavější.

Seznam použitých metod je poměrně rozsáhlý a zahrnuje přípravu homogenátu slinných žláz, imunizaci slinami, metody umožňující hodnocení vlivu slin na imunitní mechanismy vektora, nebo identifikaci jednotlivých antigenů slin imunními séry. Popis jednotlivých metod je dostatečně podrobný. K metodice mám jednu otázku, která se týká přípravy makrofágových kultur. Z popisu metodiky vyplývá, že buňky získané výplachem peritonea nebyly po 2 hodinách adheze promyty, pouze byl odsát supernatant. *Má předkladatel představu, jaké procento představují mikrofágy z buněk získaných peritoneálním výplachem?* Je totiž velmi pravděpodobné, že makrofágy tvořily jen část buněk použitých v experimentu a toto je třeba mít na zřeteli.

Kapitola výsledky zahrnuje 8 grafů, 3 obrázky elektroforetických profilů slin a imunoblotů a 4 tabulky porovnávající proteinové profily různých druhů flebotomů nebo imunoblots s imunními séry získanými po sání různých druhů flebotomů. U všech grafů je vyznačena statistická významnost, popis obrázků je dostatečně podrobný. Jan Drahota prokázal jasný inhibiční účinek slin (SGH) tří druhů flebotomů na proliferaci splenocytů z naivních myší. V případě myší imunizovaných sáním *P. sergenti* stimulační účinek homologního antigenu převýšil supresivní efekt slin. V případě lymfocytů stimulovaných *in vitro* ConA byla zaznamenána specifická proliferativní odpověď na homologní antigen, ale též zkřížená stimulační aktivita antigenů z *P. papatasi*. Sání *P. sergenti* vyvolalo produkci specifických protilátek které prakticky nereagovaly s antigeny *P. arabicus* a *P. papatasi* v ELISA testu. V případě imunizace sáním *P. duboscqi* nebyla zaznamenána specifická proliferativní odpověď na homologní antigen a SGH ze všech tří druhů flebotomů inhibovaly proliferaci lymfocytů. V této souvislosti mě napadá, že by bylo zajímavé vědět míru proliferace nestimulovaných splenocytů, která musela být naměřena, aby bylo možno stanovit proliferativní index. Jan Drahota dále prokázal inhibiční vliv SGH ze všech testovaných druhů flebotomů na produkci NO makrofágy stimulovanými LPS *in vitro*. Imunosuprese byla signifikantně nižší u makrofágů z myší na kterých dlouhodobě sáli flebotomové *P. duboscqi*. Tento efekt nezávisel na tom, zda byl použit homologní či heterologní SGH. Stanovení cytokinů IFN- γ a IL-4 bylo provedeno podle výsledků z krve myší imunizovaných sáním *P.*

duboscqi a infikovaných leishmaniemi. Podle metodiky byla séra pro stanovení cytokinů odebrána z myši imunizovaných sáním *P. sergenti*. Mezi hladinami cytokinů z imunizovaných a naivních myši nebyly nalezeny signifikantní rozdíly. Ve výsledcích není uvedeno, zda byly myši též infikovány leishmaniemi, což by se na množství produkovaných cytokinů zřejmě projevilo. V každém případě bych pro zjištění vlivu sání vektora na polarizaci Th odpovědi doporučoval stimulovat *ex vivo* kulturu lymfocytů ze spádových uzlin mitogenem a cytokiny stanovit v supernatantu této kultury. Poslední část výsledků se týkala porovnání proteinového složení SGH tří druhů flebotomů. U některých antigenů se podařilo prokázat zkříženou reaktivitu imunními séry proti odlišným druhům flebotomů.

Poměrně rozsáhlá diskuse na 7 stranách porovnává získané výsledky s literárními údaji. Do jisté míry jsou zde vysvětleny zmatky kolem testování cytokinů. V závěru diskuse autor podává podrobný výčet jednotlivých antigenů SGH (opakování výsledků), ale k žádným závěrům ohledně významu prokázané zkřížené reaktivity nedochází.

Shrnutí na závěr mi připadá odbyté. Hned v první větě chybí slovo. Zřejmě má být „srovnáním vlivu dlouhodobé a krátkodobé imunizace na imunitu myši“ Poslední věta druhého odstavce nedává smysl.

K práci mám kromě výše uvedeného několik drobnějších připomínek. V seznamu zkratk je přehozeno vysvětlení zkratk SGE a SGL, zcela zde chybí zkratka SGS.

Na str. 11, 6.a 7. řádek odspodu je nepravdivé tvrzení že platelet-activating factor hydrolyzuje fosfolipázu C. Opak je pravdou, fosfolipáza hydrolyzuje PAF. Na str. 12 bych prosil vysvětlit tvrzení že „produkce NO v makrofázích je na pomezí se získanou imunitou“. Na str. 33, 2. odst. opravdu chybí citace, jak je vyznačeno. Str. 34 nahoře: *co je opožděná hypersenzitivita I. typu?*

Str. 51. *Jak je to s protilátkami proti SGH u neimunizovaných myši. Jde o přirozené protilátky nebo nespecifitu ELISA testu?*

Na diplomové práci Jana Drahoty mne nejvíce zaujaly výsledky vlivu různých SGH na proliferaci lymfocytů. *Zajímal by mě názor autora na potlačení supresivního účinku SGH v případě, že byly použity splenocyty z imunizovaných myši homologickým antigenem. Jde o překonání imunosupresivních účinků SGH specifickou stimulací in vivo primovaných splenocytů nebo mohla suspenze splenocytů obsahovat protilátky, které by neutralizovaly imunosupresivní faktory přítomné v SGH?*

Závěr: Jan Drahoty ukázal ve své diplomové práci schopnost prostudovat světovou literaturu na dané téma, stanovit s pomocí školitelky jasné cíle, provést experimenty a s použitím vhodných metod se dobrat k zajímavým výsledkům. Tyto výsledky zasvěceně diskutovat. Současně však je z diplomové práce patrná jistá uspěchanost a s ní související nepřehlednost, která se týká zejména shrnutí získaných výsledků. Práci doporučuji k obhajobě a hodnotím ji známkou *velmi dobře*.

České Budějovice 10.9. 2009

Doc. RNDr. Jan Kopecký, CSc.